

ヒト腸管・糞便および植物性発酵食品由来の乳酸桿菌におけるラクトース資化性酵素に関する研究

著者	本田 洋之
号	49
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第769号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60207

ほんだ ひろゆき

氏 名（本 籍 地） 本 田 洋 之

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 769 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 25 年 1 月 10 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 ヒト腸管・糞便および植物性発酵食品由来の乳酸桿菌におけるラクトース資化
性酵素に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教 授 齋 藤 忠 夫

教 授 駒 井 三千夫

教 授 池 田 郁 男

論文内容要旨

第一章 緒論

乳酸菌は、ヒトや動物の消化管、発酵乳や漬物などの食品、植物などに、広く存在している。その中で、発酵乳の製造に用いられる乳酸菌は、ラクトース(乳糖、Gal β 1-4Glc)をエネルギー源として利用し、主に乳酸を産生する。発酵乳の製造に使用される乳酸菌の代表は、*Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、および *Streptococcus (Str.) thermophilus* である。コーデックス委員会の国際規格によると、ヨーグルトとは、この 2 菌種の乳酸菌を用いて発酵したものと規定されている。古くから発酵乳製造に用いられてきた乳酸菌については、効率的な乳の発酵という視点から、ラクトースの資化機構について精力的な研究が進められてきた。

乳酸菌には、2 種類のラクトース輸送系の存在が知られている。すなわち、ラクトース・パーミアーゼ系、およびラクトース・フォスフォトランスフェラーゼ系(ラクトース PTS)である¹⁾。多くの乳酸菌では、ラクトースに特異的な膜透過酵素(ラクトース・パーミアーゼ)により、菌体内にラクトースが取り込まれる。取り込まれたラクトースは、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)によって分解される。一方、多くの乳酸菌とは異なり、*Lactococcus (Lc.) lactis* などの乳酸菌では、ラクトース PTS により、ラクトースをリン酸化して取り込む。取り込まれたラクトース 6'-リン酸は、フォスフォ- β -ガラクトシダーゼ(P- β -gal)により分解される。Suzuki ら²⁾³⁾は、*Lb. gasseri* JCM1031 がラクトース 6'-リン酸の類似体である *o*- ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド 6-リン酸(ONPGal-6P)を分解する Pbg1 および Pbg2 を発現していることを確認した。その酵素のアミノ酸配列は、フォスフォ- β -グルコシダーゼ(P- β -glc)に高い相同性を有していることが分かり⁴⁾、P- β -glc が上記のラクトース 6'-リン酸の分解に関与することが示唆されている。

一方、乳酸菌の一部の菌株は、「プロバイオティクス」としての効果期待されている。「プロバイオティクス」は、1989 年に Fuller により「腸内菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」として提唱され、近年では、「適正量を摂取することにより宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物」のことと再定義されている。プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の多くは、ヒト腸管・糞便由来の菌株であるが、近年では、漬物など植物性発酵食品由来のプロバイオティクスの探索も行われている⁵⁾⁶⁾。プロバイオティクスの効果の一つに、「乳糖不耐症の軽減」が知られている⁷⁾⁸⁾。乳糖不耐症とは、ヒト空腸粘膜に存在する β -gal(ラクターゼ)の活性が低下するために、乳に含まれるラクトースを分解できず、腹痛や下痢などの症状を起こすことであり、日本人ではとくにその割合が多い。プロバイオティクスは、乳中および腸内でラクトースを分解することにより、乳糖不耐症を軽減すると考えられている。

しかし、様々な生理機能が確認されているプロバイオティクスにおけるラクトース資化機構については、十分解明されていないのが現状である。これらの乳酸菌のラクトース資化の特徴を明らかにすることは、プロバイオティック機能を有する発酵乳の製造に貢献すると考えられる。本研究では、様々な機能性を有する、ヒト腸管・糞便由来の乳酸菌 *Lb. gasseri*、および植物性発酵食品由来の乳酸菌 *Lb. brevis* のラクトース資化機構に関する基礎的知見を得ることとした。すなわち、それぞれの乳酸菌のラクトース資化に関与する主要な酵素を同定し、それらのラクトース資化性酵素の発現制御について解析した。さらに、それら乳酸菌のエネルギー獲得戦略について考察した。

第二章 ヒト腸管・糞便由来乳酸菌における 3 種類のラクトース資化性酵素の活性

ヒト腸管・糞便由来乳酸菌の様々な菌種における 3 種類のラクトース資化性酵素 (β -gal、P- β -gal、および P- β -glc) の多様性について明らかにすることとした。P- β -gal、および P- β -glc の活性測定に用いる基質 ONPGal-6P、および *o*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド 6-リン酸 (ONPGlc-6P) の化学合成を、Hengstenberg と Morse の方法⁹⁾を用いて行った。すなわち、市販の *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPGal)、または *o*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (ONPGlc) を出発物質として、オキシ塩化リン、およびリン酸トリメチルを用いてリン酸化を行った。活性炭を用いた吸着クロマトグラフィーによる脱塩の後、調製ペーパークロマトグラフィーおよびゲルろ過による精製を行った。精製した合成糖基質について、¹H-NMR を用いた構造確認と、薄層クロマトグラフィーによる純度確認を行った。

次いで、Citti らの方法¹⁰⁾により、乳酸菌 (全 65 株) における 3 種類のラクトース資化性酵素の活性を調べた。すなわち、市販の ONPGal、に加えて合成した ONPGal-6P、および ONPGlc-6P を基質として、 β -gal 活性、P- β -gal 活性、P- β -glc 活性をそれぞれ調べた。その結果、ヒト腸管・糞便由来の乳酸菌の中で比べると、*Lb. mucosae* の多くの菌株が他菌種に比べて高い β -gal 活性を持っていた (Table 1)。中でも *Lb. mucosae* OLL2848 は最も高い β -gal 活性を示したが、この活性値は、対照である *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NIAI B6 の約 8 分の 1 の値であった。また、*Lb. gasseri* は、 β -gal 活性をほとんど示さず、P- β -gal 活性、および P- β -glc 活性をともに示した。中でも、P- β -gal 活性については、*Lb. gasseri* OLL2836 が、対照の *Lc. lactis* NIAI 527 と同等の高い活性値を示した。P- β -glc 活性については *Lb. gasseri* OLL2948 が、最も高い活性を示した。ヒト腸管・糞便由来の乳酸菌の中からも、乳由来の乳酸菌と同程度の活性を持

つ菌株が見出されたことは興味深い。本章の結果から、*Lb. gasseri* は、他菌種と異なり β -gal 活性をほとんど示さず、P- β -gal 活性、P- β -glc 活性を優勢に示す、非常にユニークなラクトース資化系を有する菌種であると考えられた。

第三章 ヒト腸管由来 *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T のラクトース資化性酵素 LacG1 および LacG2 の特性解析

Lb. gasseri の基準株 ATCC33323^T のゲノム上には、7 種類のラクトース資化に関係すると考えられる P- β -gal、または P- β -glc と推定される遺伝子群 (Table 2) の存在が認められている。本菌株では、そのうち 5 種類の酵素 (LacG1、LacG2、Pbg1、Pbg2、および Pbg3) が、細胞内にタンパク質レベルで存在していることが知られている¹¹⁾。Pbg1 および Pbg2 は、*Lb. gasseri* JCM1031 の Pbg1 および Pbg2 と、それぞれ極めて高い相同性を有しており、それらの生化学的性質は既に明らかになっている⁷⁾⁸⁾。また、Pbg3 は P- β -gal 活性を有していないことが示されている。そこで、まだ知られていない LacG1 および LacG2 の性質を解析し、ラクトース資化性酵素の生化学的性質について比較研究を行った。

Lb. gasseri ATCC33323^T を、2% (w/v) ラクトースを糖源とする培地で培養した。超音波による菌体破碎の後、硫酸沈殿による酵素の粗分画を行った。次いで、陰イオン交換クロマトグラフィー (Fig. 1)、およびハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより LacG1 を精製した (Fig. 2)。また、LacG2 については、発現量が極めて少ないため、*Lc. lactis* での異種発現を行い (Fig. 3)、LacG2 の C-末端にヒスチジンタグを付けた分子として発現させ、アフィニティーカラムを用いて精製した (Fig. 4)。それぞれの酵素の N-末端アミノ酸配列を解読した結果、*Lb. gasseri* ATCC33323^T のゲノム上の LacG1 (LGAS_0344)、および LacG2 (LGAS_0502) の配列と一致することを確認した。LacG1 および組換え LacG2 (rLacG2) のカイネティック解析を行った結果、LacG1 および rLacG2 は、ともに ONPGal-6P に対する高い分子活性 k_{cat} を有していることが分かった (Table 3)。また、それらの酵素の ONPGal-6P に対する触媒効率 k_{cat}/K_m は、Pbg1 および Pbg2 よりも数倍程度高いことが分かった。また、*Lb. gasseri* ATCC33323^T のラクトース資化性酵素は、ONPGal-6P、ONPGlc-6P の両方に対する分解活性を示したことから、基質特異性の低い酵素であると考えられた。

さらに、各ラクトース資化性酵素のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。その結果、LacG1 および LacG2 は P- β -gal に近い酵素であり、Pbg1 および Pbg2 は P- β -glc に近い酵素であることが分かった (Fig. 5)。本章の結果から、LacG1 および LacG2 は、

P- β -galとしての高い活性を有し、*Lb. gasseri* ATCC33323^Tにおけるラクトース資化に強く関与すると考えられた。これまでは、陰イオン交換クロマトグラムなどから、LacG1 が *Lb. gasseri* ATCC33323^T のラクトース資化における主要な酵素であると考えられてきたが、本章の解析により、同じ P- β -gal に分類される LacG2 も高い活性を有していることが分かった。一方、これまで P- β -gal とされてきた Pbg1 および Pbg2 は、P- β -glc に再分類されるべき酵素であると考えられた。

第四章 ヒト腸管由来 *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T のラクトース資化性酵素の分子生物学的解析

5 種類のラクトース資化性酵素遺伝子のラクトース資化への寄与を明らかにするために、*Lb. gasseri* ATCC33323^T を異なる糖源 (D-グルコース、ラクトース、D-ガラクトース、セロビオース) で生育させた際の各酵素遺伝子の転写量を、リアルタイム PCR により解析した。また、*lacG1*、*pbg1*、*pbg2* の遺伝子破壊株の各種性質について調べた。

転写量解析を行う際は、試料間での逆転写の効率の差、および反応系への cDNA の持込量の差を補正する必要がある。そのためには、恒常的に一定レベルで発現している遺伝子を内在性の対照遺伝子として、目的の遺伝子の発現量を補正する必要がある。そこで、対照遺伝子の検討を行った。その結果、対数増殖期、定常期ともにプロリル-tRNA シンセターゼ遺伝子 (*proS*) の発現量の変動が非常に小さかったことより、本遺伝子を様々な糖源での転写量解析における対照遺伝子として用いた。

転写量解析の結果、*lacG1* は、ラクトース糖源で高い転写量を示した (Fig. 6)。このことから *lacG1* は、ラクトースによって強く発現が誘導されたと考えられた。また、*pbg2* は、セロビオースを糖源とした際に転写量が増大していたことから、P- β -glc の本来の基質である β -グルコシド構造を認識して発現する酵素であると考えられた。次いで、*lacG1*、*pbg1* および *pbg2* の遺伝子破壊株の各種性質について解析した結果、*lacG1* 破壊株では野生株に比べて、若干の生育の遅延が認められた (Table 4)。一方、*pbg1* 破壊株、*pbg2* 破壊株では、生育の遅延は認められなかった。以上より、*Lb. gasseri* ATCC33323^T のラクトース資化においては、LacG1 が主要な酵素であると考えられた。LacG2 は、LacG1 と同様に高い P- β -gal 活性を持つものの、ラクトース糖源での転写量が低レベルであり、陰イオン交換クロマトグラム上の活性ピークも極めて低いことから、発現量が低く、本菌株のラクトース資化への寄与は低いと考えられた。しかしながら、*lacG1* 破壊株においては、LacG2 と考えられる酵素の陰イオン交換クロマトグラムでの活性ピークが増大し、P- β -gal 活性を補足していた (Fig. 7)。このことから、LacG2 は、主要な LacG1 に変異が

生じた際に、ラクトース資化を代替するために存在していると推測される。

第五章 植物性発酵食品由来 *Lactobacillus brevis* KB290 のラクトース資化性酵素の特性解析

植物性発酵食品由来の乳酸菌 *Lb. brevis* KB290 は、ラクトースを資化できず、そのために乳を発酵しないものと考えられてきた。API 50CHL を用いて糖資化性を調べた結果、ラクトースからの酸生成は培養 1、2、7 日ですべて陰性であり、*Lb. brevis* KB290 は、ラクトースを資化しないと判定された。しかしながら、実際に *Lb. brevis* KB290 を、ラクトースを糖源とする培地で培養すると、非常に緩慢ながらもラクトースを資化し生育することが判明した (Fig. 8)。本菌株では、他の *Lactobacillus* 属乳酸菌とは異なり、D-グルコースのみの糖源環境において β -gal 活性が抑制されなかった (Fig. 9)。このことから、一般的に微生物に認められる「カタボライト抑制」の機構を有しておらず、 β -gal を構成的に発現していると推測された。そこで、*Lb. brevis* KB290 の β -gal の精製を行ったところ、SDS-PAGE の結果から、推定分子量が 72 kDa、および 35 kDa の 2 つのバンドが検出された (Fig. 10)。それぞれについて、N-末端アミノ酸配列分析を行ったところ、NH₂-MKADLTXLDD (X:未解読)、および NH₂-MDNTTKLNVI という 10 残基のアミノ酸配列が解読できた。それぞれの配列に対して、BLAST 解析を行ったところ、既にゲノムが公開されている *Lb. brevis* ATCC367 の、 β -gal 遺伝子 (YP_796339、および YP_796338) と相溶性の高い酵素であり、ヘテロ二量体として存在していると考えられた。本酵素のラクトースに対する比活性は 55 U/mg であり、これまでに報告のある、ラクトースを資化する乳酸菌での値と同程度であった。このことから、*Lb. brevis* KB290 は、確かにラクトースを分解する β -gal を有しており、本菌株のラクトース資化には、この β -gal が大きく関与すると考えられた。また、 β -gal が十分に機能していたことから推測すると、ラクトース資化が緩慢である理由として、細胞膜上のラクトース輸送体 (パーミアーズなど) の異常や欠損などの障害が生じている可能性が高い。主に植物素材中に生息する *Lb. brevis* にとって、ラクトース資化性の速度は、選択優位性をもたらさなかったと考えられた。

総括

本研究では、*Lb. gasseri* ATCC33323^T、および植物性発酵食品由来の *Lb. brevis* KB290 のラクトース資化機構について解析を行い、以下の知見を得た。

1. *Lb. gasseri* は、 β -gal 活性が極めて低く、P- β -gal、および P- β -glc 活性を共に示した。このことから、ヒト腸管・糞便由来乳酸菌の中で、*Lb. gasseri* は特殊なラクトース資化系を有していると考えられた。
2. *Lb. gasseri* ATCC33323^T の LacG1 は、高い P- β -gal 活性を示し、系統樹解析からも、P- β -gal に分類される酵素であった。また、*lacG1* は、ラクトース糖源で高い転写量を示した。本基準株のラクトース資化においては、LacG1 が主要な資化性酵素であると考えられた。
3. *Lb. gasseri* ATCC33323^T の LacG2 は、LacG1 と同様に高い P- β -gal 活性を持つものの、発現量が低く、本基準株のラクトース資化への寄与は高くないと考えられる。しかしながら、*lacG1* 破壊株において、LacG2 と推定される酵素の発現が増大し、P- β -gal 活性を補足していた。このことから、LacG2 は、主要な LacG1 に変異が生じた際に、ラクトース資化が停止することを防ぐために代替酵素として存在していると推測される。
4. *Lb. gasseri* ATCC33323^T の Pbg1 および Pbg2 は P- β -glc に分類されることが分かった。Pbg2 は、セロビオースを糖源とした際にその遺伝子の転写量がとくに増大したことから、P- β -glc の本来の基質である β -グルコシドを認識して発現する酵素であると考えられる。
5. *Lb. brevis* KB290 のラクトース資化に関与する主要な分解酵素を同定した。本菌株は、他の *Lactobacillus* 属乳酸菌とは異なり、D-グルコース糖源で β -gal 活性が抑制されなかった。このことから、 β -gal を常時発現しており、一般的な微生物に認められるカタボライト抑制の機構を有していないことが推測された。
6. *Lb. brevis* KB290 は、ラクトースを糖源とする培地で、非常に緩慢にラクトースを資化した。このことから、本菌株を乳に利用できる可能性が示された。また、ラクトースの資化性速度は、主に漬物などの植物素材に生息する *Lb. brevis* にとって、選択優位性をもたらさなかったものと考えられた。

本研究により、プロバイオティック乳酸菌 *Lb. gasseri* および *Lb. brevis* のラクトース資化における主要な酵素が同定された。さらに、それらの酵素の発現制御についての知

見が得られた。本研究で得られた知見は、ラクトース分解性を高めた発酵乳の生産や、*Lb. brevis* の乳へのさらなる利用を可能とし、今後のプロバイオティクス製品の発展に寄与することが大いに期待される。

また、*Lb. gasseri* が複数のラクトース資化性酵素を保持していることは、一見無駄に見えるが、1 つの遺伝子に変異が生じた際にラクトース資化不全に陥ることを防ぐ代替機構の役割と考えられる。腸管では、他の多くの微生物種との生存競争が行われることから、*Lb. gasseri* は複数の酵素を発現することにより、そのような環境で生き残ることができたとも考えられる。一方、*Lb. brevis* は、ラクトースの存在しない環境に生息するにも関わらず β -gal を発現しており、エネルギー的な無駄のように考えられる。しかし、*Lb. brevis* がラクトースを非常に緩慢ながらも資化したことから、このような性質を保持することにより、急激な環境変化への対応を可能にしているとも考えられた。乳酸菌は、そのような「生き残り戦略」を有することにより、長い進化の過程を辿ってきたものと推測される。

<引用文献>

- 1) de Vos W.M. and Vaughan E.E., *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 217-237 (1994)
- 2) Suzuki M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 139-141 (1996)
- 3) Suzuki M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 708-710 (1996)
- 4) Saito T. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2318-2327 (1998)
- 5) Kawahara T. and Otani H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 411-417 (2006)
- 6) Murooka Y. and Yamshita M., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 791-798 (2008)
- 7) Montalto M. *et al.*, *World J. Gastroenterol.* **12**, 187-191 (2006)
- 8) Farnworth E.R., *J. Nutr.* **138**, 1250-1254 (2008)
- 9) Hengstenberg W. and Morse M.L., *Carbohydr. Res.* **10**, 463-465 (1969)
- 10) Citti J.E. *et al.*, *J. Bacteriol.* **89**, 937-942 (1965)
- 11) Nagaoka S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1954-1957 (2008)

Table 1. β -Gal, P- β -gal, and P- β -glc activities in toluene-treated cell suspensions using various lactic acid bacteria. *

Strain	β -gal	P- β -gal	P- β -glc	Strain	β -gal	P- β -gal	P- β -glc
<i>Lb. acidophilus</i>				<i>Lb. mucosae</i>			
JCM1132 ^T	12.87	0.40	1.33	OLL2848	107.09	0.60	4.85
LA117	10.89	0.10	0.82	MEP181R12	84.26	ND	ND
<i>Lb. amylovorus</i>				MEP181R66	32.61	ND	ND
MEP181R45	6.47	0.18	48.02	MEP181R67	24.79	0.09	0.04
MEP181R50	7.29	0.25	4.80	MEP181R68	29.02	0.03	0.11
MEP181R51	6.35	0.02	1.81	MEP181R69	44.45	0.02	ND
<i>Lb. casei</i>				MEP181R70	43.91	0.07	0.10
JCM1134 ^T	12.66	3.45	1.45	MEP181R71	38.30	0.11	ND
MEP181R52	ND	2.55	0.42	MEP181R72	37.61	0.06	0.04
MEP181R53	ND	0.14	0.29	MEP181R73	26.98	ND	ND
MEP181R54	ND	0.11	0.26	MEP181R74	34.39	1.75	2.57
NIAI C9	5.18	2.98	0.43	MEP181R75	33.13	ND	0.05
<i>Lb. crispatus</i>				MEP181R76	41.06	ND	ND
MEP181R55	5.03	0.04	1.12	MEP181R77	11.62	ND	ND
MEP181R56	4.42	0.12	0.76	MEP181R78	8.09	ND	0.04
<i>Lb. fermentum</i>				MEP181R79	25.87	ND	ND
MEP181R57	8.30	0.03	0.08	MEP181R80	38.98	ND	0.03
MEP181R58	1.06	0.03	0.05	MEP181R81	34.66	0.05	0.10
<i>Lb. gasseri</i>				MEP181R82	28.26	ND	ND
ATCC33323 ^T	ND	4.18	5.72	<i>Lb. oris</i>			
JCM1031	ND	1.38	5.36	MEP181R83	11.32	ND	ND
LA2	ND	3.49	6.45	MEP181R84	7.49	0.06	0.13
OLL2836	ND	46.58	2.20	MEP181R85	7.25	ND	ND
OLL2948	ND	1.81	50.19	<i>Lb. plantarum</i>			
MEP181R34	ND	18.73	3.41	MEP181R86	5.40	0.17	1.81
MEP181R35	ND	9.63	3.37	MEP181R87	4.64	0.15	1.51
MEP181R36	ND	7.61	3.05	<i>Lb. reuteri</i>			
MEP181R40	ND	15.78	2.53	MEP181R88	8.58	ND	ND
MEP181R41	0.05	9.91	40.37	<i>Lb. salivarius</i>			
MEP181R42	ND	1.27	31.96	MEP181R89	1.62	ND	ND
MEP181R43	0.06	7.31	28.56	MEP181R90	2.96	ND	ND
MEP181R44	ND	0.93	19.66	<i>Lb. vaginalis</i>			
MEP181R46	ND	30.63	50.02	MEP181R91	6.13	0.23	2.19
MEP181R47	0.06	1.20	22.55	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			
MEP181R48	ND	8.32	22.07	NIAI B6	844.47	ND	ND
MEP181R49	ND	35.57	19.84	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			
MEP181R65	0.10	2.46	2.92	NCFB 176	ND	9.38	2.71
<i>Lb. johnsonii</i>				NIAI 527	ND	49.89	0.84
JCM1017	2.94	ND	1.21				
JCM2122	3.32	0.13	2.78				

*Hydrolysis activities on *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPGal), *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside 6-phosphate (ONPGal-6P) and *o*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 6-phosphate (ONPGlc-6P). Numbers in the table indicate 10⁻² units/mg-protein.
ND, not detected.

Table 2. Predicted proteins annotated as β -gal, P- β -gal, β -glc, or P- β -glc in *Lb. gasseri* ATCC33323^T.

Protein	Annotation	Locus_tag	Deduced M.W. (kDa)	Amino acids	Glycoside Hydrolase Family
LacG1	P- β -gal	LGAS_0344	55.6	484	GH1
LacG2	P- β -gal	LGAS_0502	55.0	475	GH1
Pbg1	β -glc / P- β -glc / β -gal	LGAS_0185	56.9	496	GH1
Pbg2	β -glc / P- β -glc / β -gal	LGAS_1668	56.5	491	GH1
Pbg3	β -glc / P- β -glc / β -gal	LGAS_0190	56.9	497	GH1
Pbg4	β -glc / P- β -glc / β -gal	LGAS_0196	54.6	465	GH1
Pbg5	P- β -glc	LGAS_1754	57.3	492	GH1

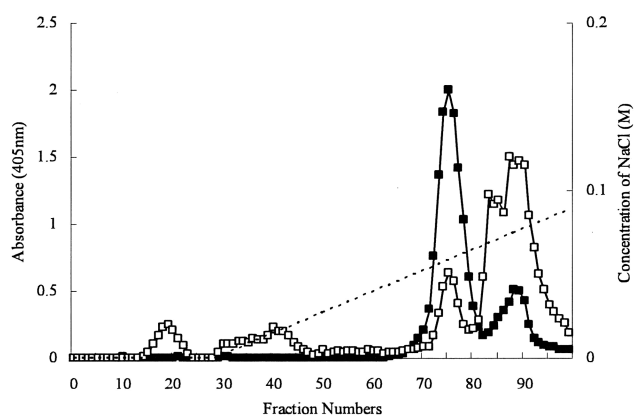


Fig. 1. Purification of P- β -gal and P- β -glc from *Lb. gasseri* ATCC33323^T using anion-exchange chromatography. Effluent fractions were assayed for P- β -gal activity (■) and P- β -glc activity (□). The broken lines indicate the concentration of NaCl. Column, DEAE-Toyopearl 650M 2.6 ϕ \times 20 cm.

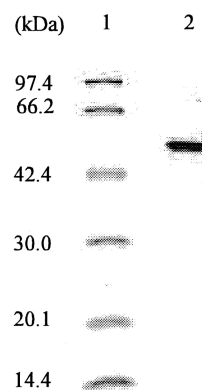


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of purified LacG1. Lane 1, molecular weight marker, proteins where the molecular weights (kDa) are on the left; Lane 2, purified LacG1.

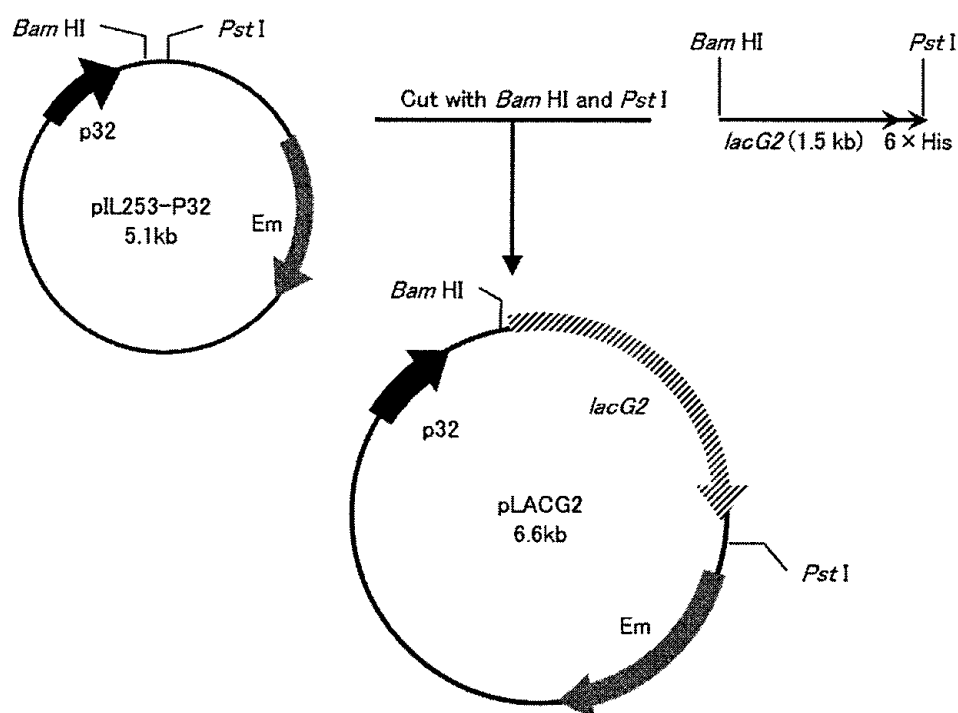


Fig. 3. Construction of pLACG2; an integrative plasmid containing the *lacG2* gene from *Lb. gasseri* ATCC33323^T.

Table 3.
The kinetic values of the P-β-gals from *Lb. gasseri* ATCC33323^T.

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	V_{max} (μmol/min/mg)	k_{cat} (/s)	k_{cat} / K_m (/s·M)
LacG1	ONPGal-6P	3.8	222	206	5.6×10^4
	ONPGlc-6P	0.66	31	28	4.4×10^4
LacG2	ONPGal-6P	5.5	388	361	9.3×10^4
	ONPGlc-6P	0.97	44	41	5.9×10^4

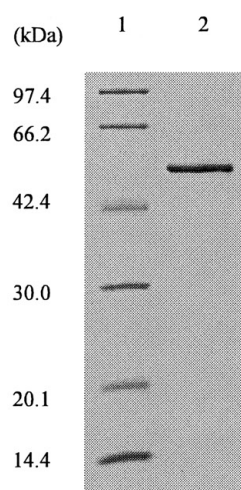


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of purified rLacG2.
Lane 1, molecular weight markers;
Lane 2, purified rLacG2.

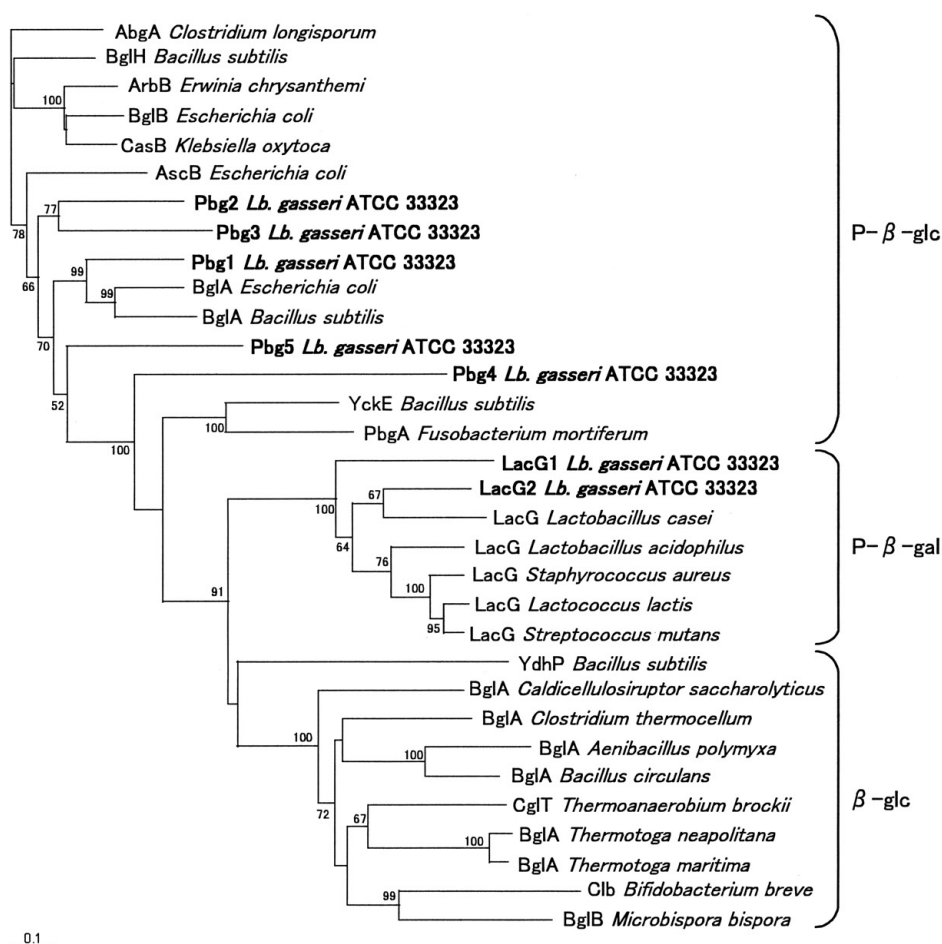


Fig. 5. Phylogenetic analysis using P-β-gal, P-β-glc and β-gal protein sequences from *Lb. gasseri* and other bacteria. The tree was constructed with the neighbor-joining method. Numbers at the branch points represent bootstrap values from 1,000 replicates; only those values greater than 50 % are shown. Bar, 10 % sequence divergence.

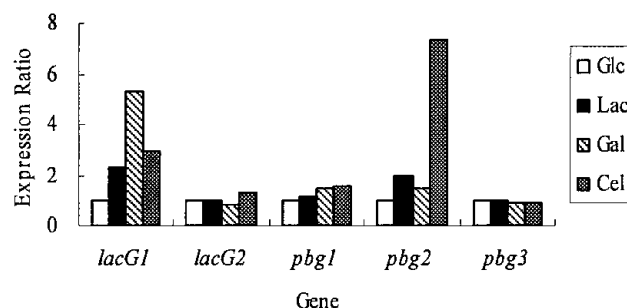


Fig. 6. Relative transcription levels of phospho- β -glycosidases in *Lb. gasseri* ATCC33323^T grown on D-glucose (Glc), lactose (Lac), D-galactose (Gal) and cellobiose (Cel). The cells were harvested in the log phase. The data are presented as relative index using glucose grown cells as a reference and represent the mean value of two biological replicates.

Table 4.
Growth of *Lb. gasseri* derived strains in the media supplemented with lactose.

Strain	OD ₆₅₀	pH
Wild-type	1.71	4.10
$\Delta lacG1$	1.57	4.44
$\Delta pbg1$	1.83	4.05
$\Delta pbg2$	1.69	4.13

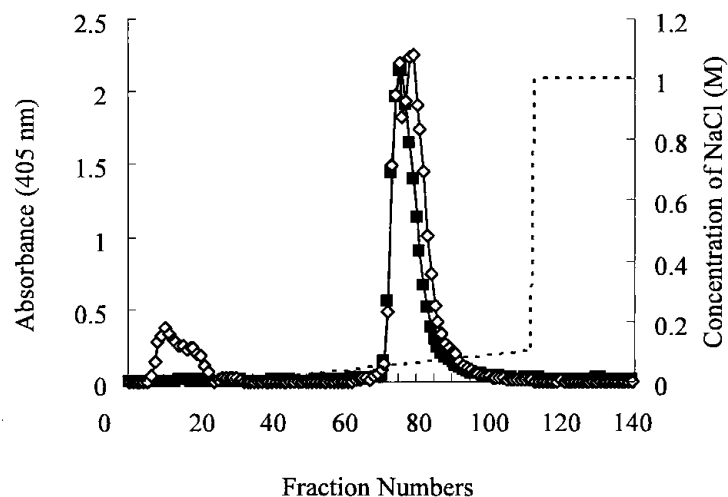


Fig. 7. Elution profiles of P- β -gal and P- β -glc from $\Delta lacG1$ strain using anion-exchange chromatography. Effluent fractions were assayed for P- β -gal activity (■) and P- β -glc activity (◇). The broken lines indicate the concentration of NaCl. Column, DEAE-Toyopearl 650M 2.6 ϕ \times 20 cm.

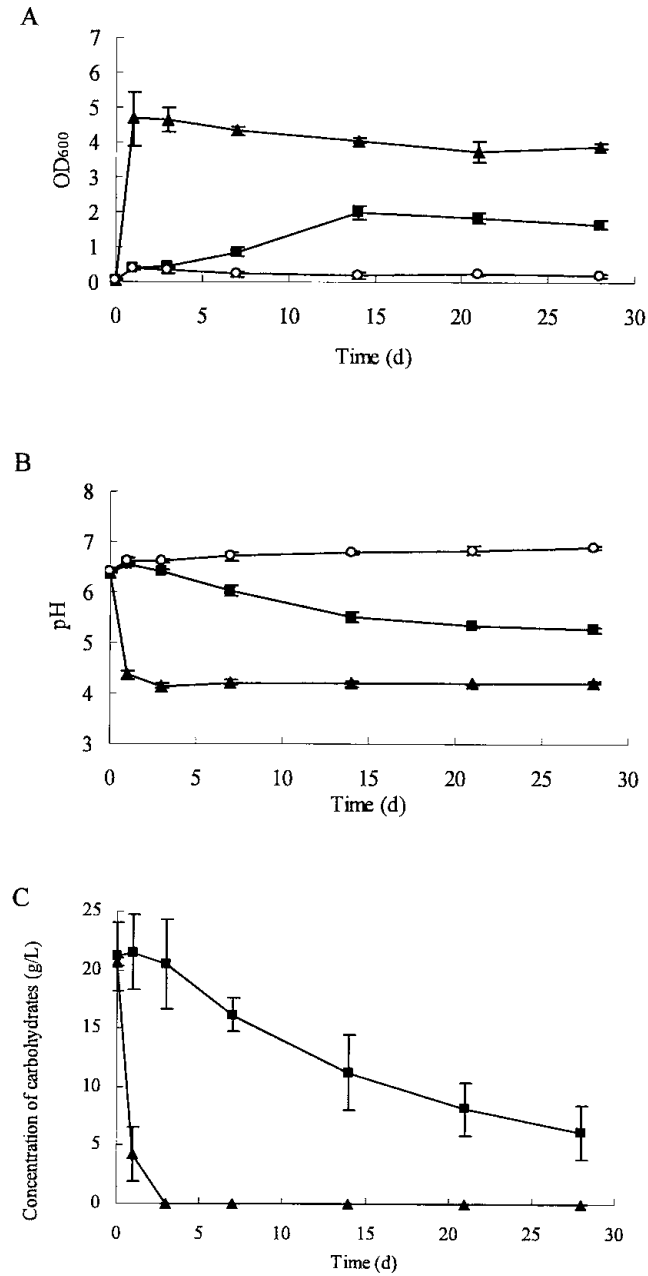


Fig. 8. The changes in (A) OD₆₀₀, (B) pH, and (C) residual carbohydrates concentration when *Lb. brevis* KB290 is cultured with lactose (■), with D-glucose (▲) or without (○). Lactose and D-glucose were not detected in the culture without carbohydrates during 28 days. The data are from three independent experiments.

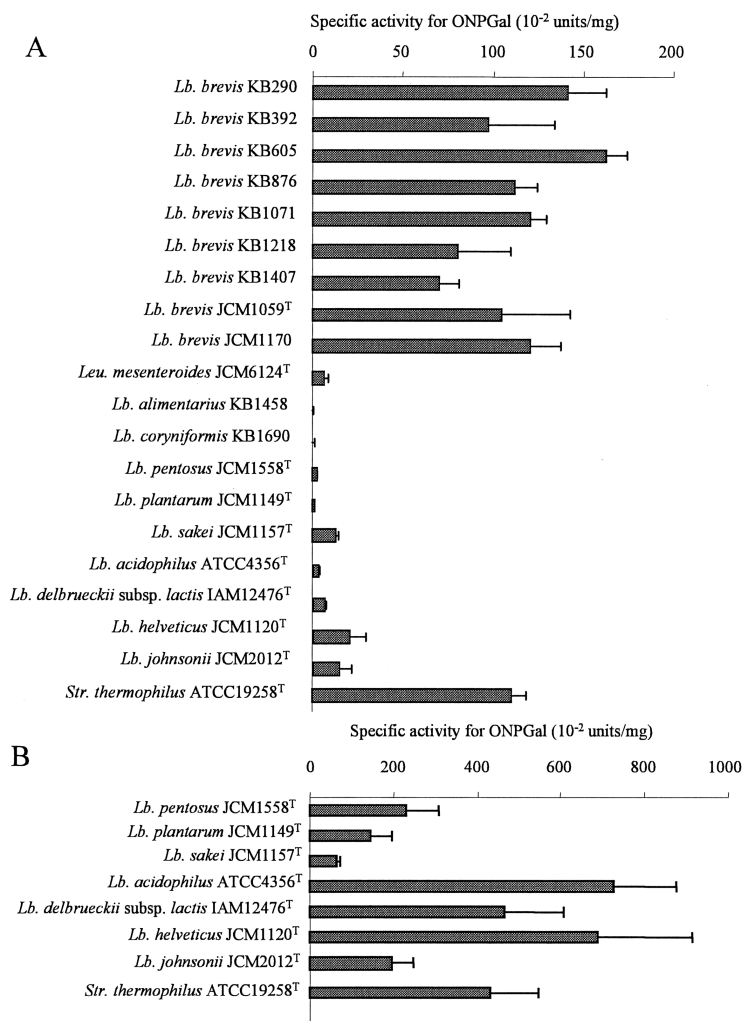


Fig. 9. β -Gal activity of lactic acid bacteria. Strains were cultured in MRS broth supplemented with (A) glucose or (B) lactose. They were harvested and vigorously mixed with toluene-acetone. Determination of β -gal activity was performed at 37 °C using 5 mM ONPGal. The data are from three independent experiments.

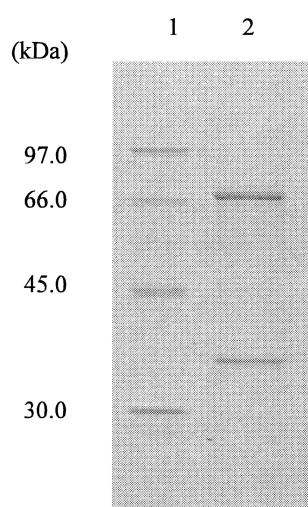


Fig. 10. Determination of the approximate molecular mass of β -gal from *Lb. brevis* KB290 using SDS-PAGE analysis. Lane 1, molecular mass markers; Lane 2, purified β -gal.

論文審査結果要旨

多くの生理機能が確認されている乳酸菌やプロバイオティクスにおけるラクトース(乳糖)資化機構については、十分解明されていない。本研究では、日本人に多い乳糖不耐症を改善するために、ヒト腸管・糞便由来の乳酸菌 *Lb. gasseri* ATCC 33323^T および植物性発酵食品由来の乳酸菌 *Lb. brevis* KB290 のラクトース(乳糖)資化性について検討した。まず、乳糖資化性の高い菌のスクリーニングから開始し、主要なラクトース資化性酵素群を同定し、それら酵素の発現制御機構を解明し、最終的に同菌のエネルギー獲得戦略について考察した。

Lb. gasseri は、 β -galactosidase(gal)活性が極めて低く、Phospho(P)- β -gal、および P- β -glucosidase(glc)活性を共に示したこのことより、ヒト腸管・糞便由来乳酸菌の中で、ガセリ菌は特殊なラクトース資化系を有していると考えられた。

Lb. gasseri ATCC33323^T(基準株)の酵素 LacG1 は高い P- β -gal 活性を示し、系統樹解析からも P- β -gal に分類される酵素であった。また、*lacG1* は、ラクトース糖源で高い転写量を示し、LacG1 が本菌の主要な資化性酵素と同定された。基準株の酵素 LacG2 は、LacG1 と同様に高い P- β -gal 活性を示すが発現量が低く、ラクトース資化への寄与率は高くないと考えられた。しかし、*lacG1* 破壊株において、LacG2 と推定される酵素の発現が増大し、P- β -gal 活性を補足したことより、LacG2 は主要な LacG1 に変異が生じた際の代替酵素と推定された。基準株の酵素 Pbg1 および Pbg2 は、P- β -glc に分類されることが分かった。Pbg2 は、セロビオースを糖源とした際にその遺伝子の転写量がとくに増大したことより、P- β -glc の本来の基質である β -グルコシドを認識して発現する酵素と推定された。

一方、漬物起源の植物性乳酸菌である *Lb. brevis* KB290 のラクトース資化に関与する主要な分解酵素を同定した。本菌株は、他の *Lactobacillus* 属乳酸菌とは全く異なり、D-グルコース糖源で β -gal 活性が抑制されず、一般的な微生物に認められる「カタボライト抑制」の機構を有していなかった。本菌は、ラクトースを糖源とする培地で、非常に緩慢ではあるがラクトースを資化したことより、本菌を乳製品に利用できる可能性が示された。

本研究により、プロバイオティック乳酸菌 *Lb. gasseri* および *Lb. brevis* のラクトース資化における主要なラクトース資化性酵素が全て同定され、その発現制御についての知見が得られた。本研究で得られた知見は、乳糖分解性を高めた発酵乳の生産やさらなる高度利用を可能とし、今後のプロバイオティクス製品の発展に寄与することが大いに期待された。

以上のことから、審査員一同は本論文提出者に対し博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。